

Kristiina Granholm

Listerian kvalitatiivisen määrittämenetelmän kehittäminen

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko

Laboratorioalan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

5.12.2013

Tekijä Otsikko	Kristiina Granholm Listerian kvalitatiivisen määrittämenetelmän kehittäminen
Sivumäärä Aika	29 sivua + 3 liitettä 5.12.2013
Tutkinto	Laboratorioanalyttikko
Koulutusohjelma	Laboratorioalan koulutusohjelma
Ohjaajat	Mikrobiologi, Anna-Mari Alanen Lehtori, Jarmo Palm
<p>Listeriaa tavataan maaperässä, vedessä ja eläimissä lähes kaikissa eläinlajeissa. Sitä tavataan myös oireettomilla, terveillä ihmisillä suolistossa. <i>Listeria monocytogenes</i> on patogeeninen sekä ihmisille että eläimille. Se voi aiheuttaa keskenmenoja raskaana oleville naisille sekä keuhkokuumetta vanhuksille ja pikkulapsille. Listeria on lyhyt gram-positiivinen sauva, katalaasiposiitivinen ja oksidaasinegatiivinen.</p> <p>Opinnäytetyö tehtiin Saarioinen Oy:lle. Työn tavoitteena oli ottaa käyttöön listeriabakteerien uusi LPT-tutkimusmenetelmä, jonka avulla saataisiin tulokset nopeammin ja vähemmällä työajalla kuin aikaisemmin. Menetelmän kehittäminen koostui erillisistä parametreista, joilla tarkasteltiin menetelmän oikeellisuutta, määrittärajaa, spesifisyyttä sekä herkkyyttä. Menetelmän ulkoinen pätevyys on osoitettu osallistamalla SLV:n järjestämiin vertailukokeisiin.</p> <p>Listerian toteamisessa LPT-menetelmällä käytettiin yksivaiheista rikastusta. Näytteet tutkittiin MiniVidas-immunoanalyysointilaitteella, joka on ELISA-pohjainen menetelmä ja perustuu immunofluoresenssiin. Positiivisiksi todetuista näytteistä tehtiin siirrostus ALOA-maljalle. Tyypillisistä pesäkkeistä tehtiin puhtasviljelmät naudan veriagarille ja tyypilliset pesäkkeet varmennetaan API Listeria -testillä ja tarvittaessa gram-värijäykellä.</p> <p>Opinnäytetyössä suoritettiin kevyempi osittainen validointi, jonka tarkoituksena oli osoittaa menetelmän toimivuus. Menetelmä on jo kansainvälisissä tutkimuksissa validoitu ja standardoitu. Validoinnin perusteella testattua Listerian tutkimismenetelmää voidaan pitää pätevänä osoittamaan <i>Listeria spp</i> -bakteerit erilaisista elintarvike- ja ympäristönäytteistä.</p>	
Avainsanat	Listeria, <i>L. monocytogenes</i> , miniVIDAS, LPT

Author Title	Kristiina Granholm Development of Qualitative Method for Determining Listeria
Number of Pages Date	29 pages + 3 appendices 5th December 2013
Degree	Bachelor of Laboratory Science
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Anna-Mari Alanen, Microbiologist Jarmo Palm, Senior Lecturer
<p>Listeria can be found in soil, water, and in almost any species of animals. It can also be carried by healthy, symptomless humans in their intestines. <i>Listeria monocytogenes</i> is pathogenic for both humans and animals causing miscarriages as well as pneumonia in elderly people and little children. Listeria is a short Gram-positive rod-shaped bacterium, catalase-positive and oxidase-negative, and it hydrolyzes esculin.</p> <p>The objective of the thesis was to introduce a new VIDAS method of researching <i>Listeria spp</i> bacteria, which would help to get the results faster and more efficiently than before. The validation consisted of separate parameters that examined authenticity, detection limit, specificity and sensitivity of the method. The external validity of the method has been authenticated by taking part in comparative tests arranged by SLV.</p> <p>Single-stage enrichment was applied when using the LPT method for detecting listeria. A ready-to-use LPT liquid was used in the enrichment process. After incubation, the concentrate was analyzed in a VIDAS run. The samples were examined using the MiniVidas immuno analyzer, which is an ELISA-based method, and is based on immunofluorescence antibody detection.</p> <p>For positive samples, an inoculation was performed on a solid and selective growth medium that includes an indicator system. Pure cultures were made of typical colonies on a cattle blood agar. Typical colonies were confirmed by using the API Listeria test, and Gram dyeing, when necessary.</p> <p>A simpler, partial validation was performed to prove the operability of the method. The method has already been validated and standardized in international researches. According to the validation, the tested research method of listeria can be regarded as a valid way to identify <i>Listeria spp</i> bacteria in different kinds of grocery or environmental samples.</p>	
Keywords	Listeria, L. monocytogenes, MiniVIDAS, LPT

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	<i>Listeria monocytogenes</i>	2
2.1	Historia	2
2.2	Ominaisuudet, kasvuolosuhteet ja esiintyvyys	3
2.3	Patogeenisyys	3
2.4	Esiintyvyys elintarvikkeissa	4
2.5	Valvonta	5
3	VIDAS	7
3.1	MiniVIDAS	7
3.1.1	Laitteen rakenne ja toiminta	7
3.1.2	Antigeenidetektio	8
3.2	LPT-testikitti	9
3.2.1	Määrityksen suorittaminen	9
3.2.2	Tulosten tulkinta	9
3.3	LPT-liemi	10
3.4	Näytteiden valmistaminen	10
3.5	API Listeria	14
4	Mikrobiologisen menetelmän validointi	15
4.1	Mikrobiologisten menetelmien epävarmuus	15
4.2	Validoinnin suureet	16
4.2.1	Oikeellisuus	16
4.2.2	Toteamis- ja määritysraja	16
4.2.3	Spesifisyys ja herkkyys	17
4.2.4	Ulkoinen pätevyys	17
5	Työn suoritus	18
5.1	Matriisien ja mikrobipitoisuuksien valinta	18
5.2	Keinotekoiseen kontaminointiin käytetyn kannan kasvatus ja valmistus	20
5.3	Matriisien keinotekoinen kontaminointi	21
5.4	Maljojen lukeminen ja jatkotestit	22

6	Tulokset	23
6.1	Oikeellisuus	23
6.2	Toteamis- ja määritysraja	24
6.3	Spesifisyys ja herkkyys	25
6.4	Ulkoisen pätevyys	25
6.5	Ajan käytön ja kustannusten vertailu	27
7	Päätelmät	28
	Lähteet	29
	Liitteet	
	Liite 1. ALOA-agarin koostumus	
	Liite 2. LPT-liemen koostumus	
	Liite 3. 32 rinnakkaisen näytteen tutkimustulokset	

Lyhenteet

ALOA	Agar Listeria Ottaviani & Agosti
ISO	International Standard Organization
NMKL	Nordic Committee for Food Analyses
PCA	Plate Count Agar
SLV	Livsmedelsverket (National food agency)

1 Johdanto

Opinnäytetyö tehtiin Saarioinen Oy:n laadunohjauksen laboratoriossa kesällä 2013. Saarioisella on tuotantolaitoksia Suomessa kaiken kaikkiaan neljä; Sahalahdessa, Huitisissa, Jyväskylässä ja Valkeakoskella. Tuotantolaitosten mikrobiologiset näytteet tutkitaan keskitetysti Sahalahden laboratoriossa.

Saarioisella on ollut käytössä *Listeria spp* -bakteerin Vidas LIS-tutkimusmenetelmä jo vuosia ja se on ollut akkreditoituna elintarvike- ja tuotantoympäristönäytteille vuodesta 2010 alkaen. Menetelmä on standardin ISO 11290-1 (1996) + muutoslehti (2005); BioMerieux Vidas-ohje (AFNOR 1999) mukainen.

Opinnäytetyön tavoitteena oli ottaa käyttöön listeriabakteerien uusi tutkimusmenetelmä, jonka avulla saataisiin tulokset nopeammin ja vähemmällä työajalla kuin aikaisemmin. Menetelmän kehittäminen koostui erillisistä parametreistä, joilla tarkasteltiin menetelmän oikeellisuutta, määrittäjärajaa, spesifisyyttä sekä herkkyyttä. Menetelmän ulkoinen pätevyys on osoitettu osallistamalla SLV:n järjestämiin vertailukokeisiin

Listerian toteamisessa LPT-menetelmällä käytetään yksivaiheista rikastusta. Inkuboinnin jälkeen rikaste analysoidaan VIDAS-laitteistolla. Positiivisiksi todetuista näytteistä tehdään siirrostus kiinteälle, valikoivalle, indikaattorisysteemin sisältävälle elatusaineelle. Tyypillisistä pesäkkeistä tehdään puhdasviljelmät. Tyypilliset pesäkkeet varmennetaan API Listeria -testillä ja tarvittaessa gram-värjäyksellä.

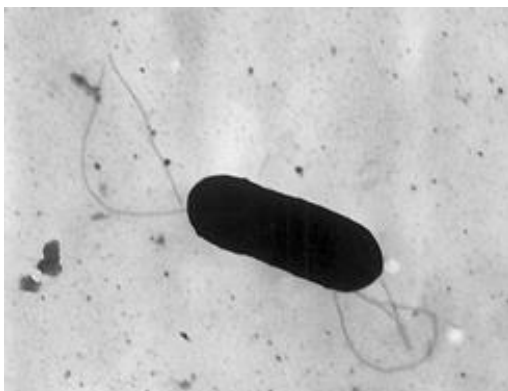
Uutta LPT-menetelmää käyttämällä tulokset saadaan valmiiksi 48 tuntia aikaisemmin kuin käytössä olevalla LIS-menetelmällä. LIS-menetelmässä käytetään kaksivaiheista rikastusta, ja siten tutkimuksessa kuluu useampi päivä.

2 *Listeria monocytogenes*

2.1 Historia

Listerioosi on *Listeria monocytogenes* -bakteerin aikaansaama sairaus, joka on ollut julkisesti tietoisuudessa vasta 1960-luvulta lähtien, vaikka se tunnettiin jo 1910-luvulla. Listerioosia voi esiintyä sekä eläimillä että ihmisillä. Se on harvoin esiintyvä sairaus, mutta kuitenkin vaarallinen. Heikentyneen vastustuskyvyn omaaville se voi aiheuttaa epidemioita ja tyypillisesti infektion lähteenä ovat elintarvikkeet.

Vuonna 1911 Ruotsalainen Gustav Hülphers löysi kaniinin maksasta gram-positiivisen bakteerin, jonka hän nimesi *Bacterium hepatis* -bakteeriksi. 15 vuotta myöhemmin E.G.D Murray löysi samanlaisen bakteerin kaniineista, ja havaitsi valkosolujen monosyyttien lisääntyvän veressä. Bakteerin nimeksi hän antoi *Bacterium monoytogenes*. Vuonna 1929 Tanskalainen Nyfeldt löysi bakteerin potilaalta. Vuonna 1927 Harvey Pirie antoi bakteerille nimen *Listerella* Joseph Listerin mukaan. Myöhemmin viimein bakteerin nimeksi tuli *Listeria monocytogenes*. Kuvassa 1 on elektronimikroskooppikuva flagellaisesta *L. monocytogenes* -bakteerista. [1, s. 55.]



Kuva 1. *L. monocytogenes* on gram-positiivinen sauva.

Listerioita tunnetaan kaikkiaan kuusi eri lajia: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* ja *L. grayi*. *L. monocytogenes* on näistä ainoa patogeeni, joka aiheuttaa ihmisillä sekä eläimillä tauteja. *L. ivanovii* on lähinnä lammaspatogeeni, jonka epäillään aiheuttavan hyvin harvoin sairauksia ihmisille. Muut listerialajit eivät aiheuta sairauksia ihmisille. [2, s. 63.]

2.2 Ominaisuudet, kasvuolosuhteet ja esiintyvyys

L. monocytogenes -bakteeria esiintyy maaperässä, luonnonvesissä, jätevesissä, kasveissa, rehuissa sekä eläinten ja ihmisten suolistossa. Eläimet voivat toimia joko listerian oireettomina kantajina tai bakteeri aiheuttaa niissä taudin. *L. monocytogenes* kasvaa hapellisissa ja myös hapettomissa olosuhteissa. Se sietää suuria suolapitoisuuksia ja pystyy kasvamaan jopa 25 %:n suolapitoisuudessa. Se voi säilyä vuosia kuivatuissa ja pakastetuissa elintarvikkeissa. *L. monocytogenes* kasvuvaatimukset on koottu taulukkoon 1. [3, s. 56.]

Taulukko 1. *L. monocytogenes* kasvuvaatimukset. [3, s. 13.]

Olosuhteet	Kasvuarvo
Lämpötila	-0,4 – 44 °C
pH	4,1 – 9,6
Vesiaktiivisuus	< 0,92
NaCl %, estää kasvun	> 10,0 %
O ₂	Hapeton ja hapellinen ympäristö

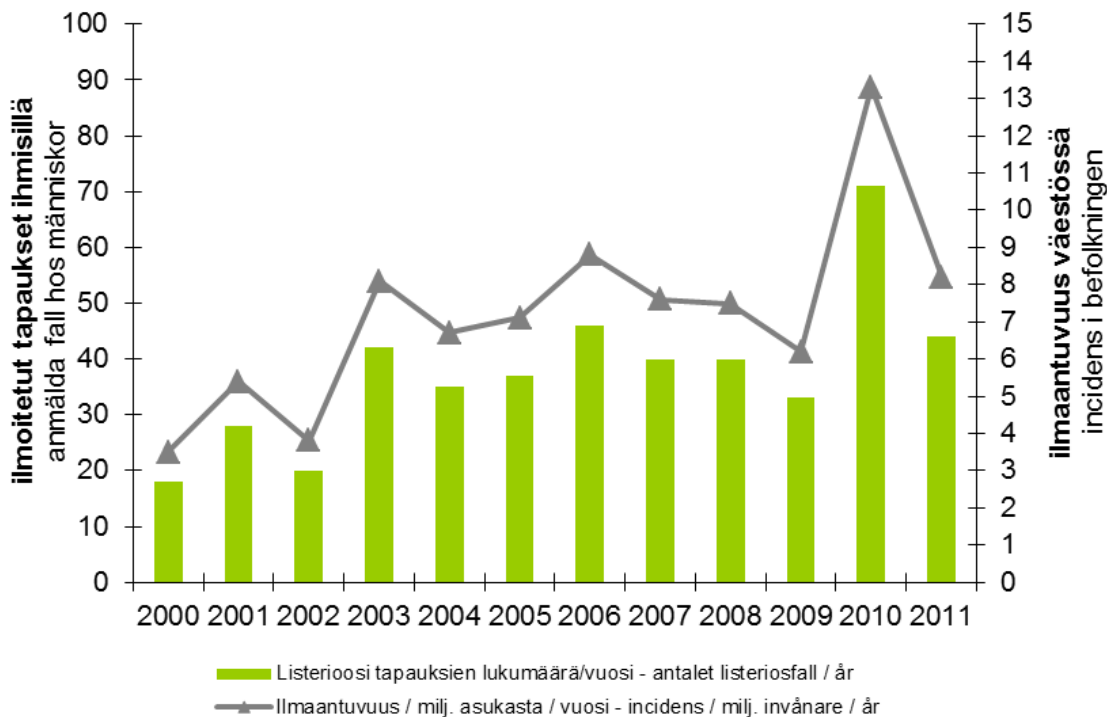
2.3 Patogeenisyys

L. monocytogenes on patogeeninen ympäristöbakteeri, joka on erityisen kestävä hankalissakin olosuhteissa. Listeria on lyhyt grampositiivinen sauva, jonka halkaisija on 0,5 µm ja pituus 0,5 - 2,0 µm.

L. monocytogenes kykenee lisääntymään jääkaappilämpötiloissa, mikä on haasteellista elintarvikkeiden säilytykselle. Se saattaa aiheuttaa vastustuskyvyltään heikentyneelle henkilölle aivokalvotulehduksen tai verenmyrkytyksen sekä raskaana olevalle naiselle keskenmenon. Noin 1 - 5 %:lla ihmisistä bakteeria löytyy ulostenäytteistä.

Listerioosiin sairastuu vuosittain 20 - 60 henkilöä, suurin osa sairastuneista on ollut yli 70-vuotiaita. Listerioosi ilmenee raskaana olevilla kuumetautina, joka muistuttaa tavallista influenssaa ja voi johtaa ennenaikaiseen synnytykseen tai keskenmenoon. Terveille henkilöille listerioosi voi aiheuttaa suolisto-oireita, kuten pahoinvointia, vatsakipuja,

päänsärkyä ja kuumetta. Se voi olla myös oireeton. Kuvassa 2 on ilmoitetut listerioositapaukset vuosilta 2000 - 2011 tartuntatautirekisterissä. [4.]



Kuva 2. Tartuntatautirekisteriin ilmoitetut listerioositapaukset 2000 - 2011. [15.]

2.4 Esiintyvyys elintarvikkeissa

2000-luvulla listerioosi on ollut neljänneksi yleisin elintarvikkeista saatu tartunta Suomessa. *L. monocytogenes* ilmenee pieninä pitoisuuksina pastöroimattomassa maidossa, lihavalmisteissa, kalavalmisteissa, kasviksissa ja valmisruuissa. *Listeria*-bakteerien määrä ei saa ylittää 100 pmy/g viimeisenä käyttöpäivänä, mikä on lakisääteinen raja-arvo. [4.]

Listeria pystyy säilymään hyvin elintarvikkeiden valmistustiloissa ja saastuttamaan valmiita tuotteita ennen niiden pakkaamista. *L. monocytogenes* on ominaisuuksia, jotka tekevät siitä vaikean torjuttavan elintarviketeollisuudessa. Bakteeria esiintyy usein tuotantotilojen lattiakaivoissa, pinnoilla ja paikoissa, joissa on orgaanista jätettä. Useimmiten tuotteet kontaminoituvat pinnoilta, joiden kanssa elintarvikkeet ovat kontaktissa.

Listeriaa esiintyy noin 4 - 5 %:ssa raakamaidoista. Yleisyys pehmeissä juustoissa on mittavampi. Pastörintiprosessi tuhoaa listeriabakteereita 72 °C:ssa. Jos tuotantoympäristöstä lähtöisin oleva *L. monocytogenes* on jälkisaastuttanut valmiin tuotteen, sitä voidaan todeta myös kuumennetuista tuotteista. Jälkisaastumisen vaara on sitä suurempi, mitä enemmän valmiita tuotteita valmistuksen jälkeen käsitellään. Aikaisempi *L. monocytogenes* -kanta voi kunnan pesusta riippumatta säilyä tuotantolaitoksessa monia vuosia saastuttaen ajoittain tuotteita. [2, s. 64.]

Vähäisen lisäaineiden ja suolapitoisuuden suosiminen, uudet pakkaustavat sekä myynti- ja kylmäketjujen pidentyminen vaikuttavat listerian säilyvyyteen ja lisääntyvyyteen riskielintarvikkeissa. Valmisruuat on usein pakattu vakuumiin tai muunnetun ilmakehän pakkauksiin, mikä mahdollistaa listerian kasvun. Tällaisia riskielintarvikkeita ovat kuumentamatta syötäväksi tarkoitetut tuotteet, kuten tyhjiöpakatut, graavisuolatut ja kylmäsavustetut kalatuotteet. Erilaisia pehmeitä tuore- ja homejuustoja pidetään myös riskielintarvikkeina. Riskielintarvikkeista erityisesti tyhjiöpakattuja kalastustuotteita on tutkittu Suomessa, sillä niistä on löydetty *L. monocytogenes* -bakteereja. Näistä ja listerioosipotilaista on vuosittain toistuvasti todettu identtisiä *L. monocytogenes* -genotyyppisiä Eviran ja THL:n kantakokoelmiin tulleiden kantojen vertailussa. Tutkimuksista ilmenee, että bakteeri on yleistynyt suojakaasu/tyhjiöpakatuissa, kylmäsavustetuissa sekä graavisuolatuissa kalatuotteissa. [2, s. 64; 3, s. 58 - 59.]

2.5 Valvonta

Sellaisenaan syötäviin elintarvikkeisiin suunnataan viranomaisvalvontaa. Erityisesti valvotaan sellaisia elintarvikkeita, joissa listeria saattaa kasvaa, sekä imeväisille ja erityisiin lääkinnällisiin tarkoituksiin tarkoitettuja valmisteita, koska *L. monocytogenes* voi vaarantaa terveyden. Valvontaa kohdistetaan ennen kaikkea kyseessä olevia tuotteita valmistaviin tehtaisiin ja elintarvikelaitoksiin.

L. monocytogenes -bakteeria koskevat vaatimukset sellaisenaan syötäville elintarvikkeille on säädetty *Komission asetuksen (EY) No 2073/2005 Elintarvikkeiden mikrobiologiset tutkimukset, muutettu komission asetuksella (EY) Nro 1441/2007* mukaan. Raja-arvot tuotteille on koottu taulukkoon 2. [3, s. 63.]

Taulukko 2. Markkinoilla olevien tuotteiden raja-arvot. [3, s. 63.]

Sellaisenaan syötävät elintarvikkeet, jotka on tarkoitettu imeväisille ja erityisiin lääkinällisiin tarkoituksiin.	ei todettu/25 g
Muut kuin imeväisille tai erityisiin lääkinällisiin tarkoituksiin tarkoitettut sellaisenaan syötävät elintarvikkeet, joissa <i>L. monocytogenes</i> voi kasvaa.	100 pmy/g viimeisenä käyttöpäivänä
Muut kuin imeväisille tai erityisiin lääkinällisiin tarkoituksiin tarkoitettut sellaisenaan syötävät elintarvikkeet, joissa <i>L. monocytogenes</i> ei kasva.	100 pmy/g

Tuotteita valmistavien tehtaiden on laadittava näytteenotto- ja tutkimussuunnitelma osana omavalvontasuunnitelmaansa. Näytteenotto ja mikrobiologiset tutkimukset tehdään Eviran antaman ohjeen mukaan [12.] Ohjeessa suositellaan näytteenottotiheyksiä listeriavalvontaan. Jos havaitaan listeriaa, valmistajien pitää ottaa listerianäytteitä tuotantoympäristöstä ja -laitteista. Lisäksi turvallinen myyntiaika määritetään, eikä vaatimus enintään 100 pmy/g saa ylittyä. [3, s. 63 - 64.]

Vähittäismyymytipaikoissa pidetään huoli, että myynti- ja tarjoiluajat sekä säilytysolosuhteet vastaavat vaatimuksia. Kun vähittäismyynnissä on sellaisenaan syötäviä tuotteita, joissa listeria voi kasvaa, pitää tehdä listeriatutkimuksia ja näytteenottoa ohjeen mukaisesti. Muun muassa auditoinnilla, tarkastuksilla ja seurannalla valvotaan, täyttävätkö sellaisenaan syötävät elintarvikkeet lainmukaiset vaatimukset. [3, s. 64.]

3 VIDAS

3.1 MiniVIDAS

3.1.1 Laitteen rakenne ja toiminta

MiniVIDAS (BioMérieux) on suppeampi versio VIDAS-järjestelmässä. Siinä on sisäänrakennettu tietokone ja tulostin. Laitteessa on kaksi osaa ja yhteen osaan mahtuu kuusi näytettä, eli yhdellä ajolla voi tutkia 12 näytettä. (Kuva 3.)



Kuva 3. MiniVidaksessa on paikat 12 näytteelle.

Jokaisella analyysillä on täydellinen jäljitettävyys (viivakoodi, täydellinen testiraportti). Laitteella käytetään vain valmiskittejä. Analyysi on automatisoitu kokonaan näytteen asettamisesta tulosten raportointiin. [5.]

Reagenssiliuskat

Reagenssiliuska koostuu kymmenestä foliolla peitetyistä ja merkityistä kaivosta. Liuskan tunnus luetaan viivakoodista, joka kertoo määrityksen koodin, laatikon eränumeron ja

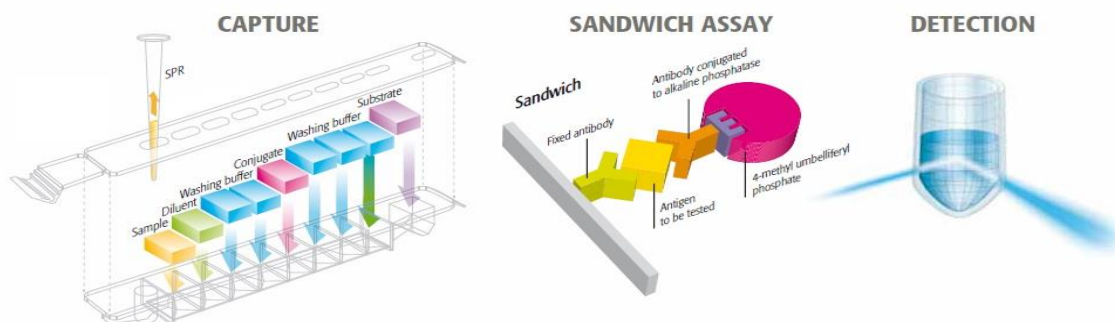
viimeisen käyttöpäivän. Ensimmäisessä kaivossa on valmiiksi näytteelle tehty aukko. Liuskan viimeisessä kaivossa on kyveti, jossa fluorometrinen mittausta suoritetaan. Keskeillä olevat kaivot sisältävät reagenssejä, joita määrityksessä vaaditaan. Kun ajo on ohi, liuska nesteineen on turvallista hävittää tavallisiin jätteisiin. [6, s. 20.]

SPR-kärki

SPR (Solid Phase Receptacle) -kärki on pipetiksi muotoiltu, ja se on valmistettu polypropeenista ja polystyreenistä. Kärjen sisäinen pinta on päällystetty antigeenillä, joka nappaa proteiineja, viruksia, bakteereja ja kokonaisia soluja. Laite automaattisesti kiertää reagensseja sisään ja ulos SPR:stä useassa analyysin osassa huolehtiakseen lisääntyneestä pintakosketuksesta, generoidakseen laajennettua nestesekeitusta tai siirtäkseen nesteitä kaivosta toiseen. [6, s. 21.]

3.1.2 Antigeenidetektio

Näytettä pipetoidaan edestakaisin kärjestä, jotta kohde saadaan sidottua kärjen sisään. Kaivossa oleva pesuliuos poistaa kärjestä sitomattoman näytteen. Seuraava reagensikaivo sisältää entsyymikonjugoitua vasta-ainetta kohdeorganismille. Vasta-aine sitoutuu kohdeorganismiin muodostaen sandwich-rakenteen (vasta-aine-antigeeni-vasta-aine-kompleksi). Toinen pesukierros poistaa sitoutumattoman konjugoidun vasta-aineen. Seuraavaksi annostellaan substraatti ja mikäli vasta-aine-antigeeni-vasta-aine-kompleksi on muodostunut, niin entsyymireaktion lopputuote fluoresoi. Viimeisessä vaiheessa seos siirretään optiseen kyvettiosaan, jossa fotodiodi tunnistaa fluoresenssin. ELISA-pohjaisen menetelmän periaate selitetään kuvassa 4. [6, s. 24.]



Kuva 4. ELISA-pohjaisen menetelmän toimintaperiaate.

3.2 LPT-testikitti

3.2.1 Määrityksen suorittaminen

VIDAS Listeria LPT on immunofluoresenssiin perustuva määritysmenetelmä listeria-antigeenien havaitsemiseksi. LPT-testikitti sisältää 60 LPT-liuskaa ja kärkeä, standardin sekä positiivisen ja negatiivisen kontrollin. SPR-kärjet on päällystetty vasta-aineilla listeriaa kohtaan. Määrityksen kaikki reagenssit ovat heti käyttövalmiita ja annosteltu sinetöityihin reagenssiliuskoihin. Kaikki määrittäksen vaiheet MiniVidas-laitteisto suorittaa automaattisesti.

VIDAS-analyysia varten näytteen rikastuslientä annostellaan reagenssiliuskaan. Näytteessä olevat mahdolliset antigeenit sitoutuvat SPR-kärjen listeria-vasta-aineisiin. Sitoutumattomat näytteen komponentit pestään pois. Alkalisella fostataasilla konjugoidut vasta-aineet kiinnittyvät sellaisiin listeria-antigeeneihin, jotka ovat sitoutuneet SPR-seinän vasta-aineisiin.

Viimeinen pesuvaihe poistaa sitoutumattoman konjugoidun vasta-aineen. Viimeisen määrittäsvaiheen aikana substraattia (4-metyyliumbelliferyylifosfaattia) kierrätetään sisään ja ulos SPR-kärjestä. Vasta-aineeseen kytketty entsyymi katalysoi substraatin hydrolyysiä fluoresoivaksi tuotteeksi. Syntyvä fluoresenssi mitataan aallonpituudella 450 nm.

Määrityksen lopussa MiniVidas alanysoi tulokset automaattisesti ja kullekin näytteelle luodaan testiarvo. Tätä arvoa verrataan sisäisiin kynnysarvoihin ja kukin tulos tulkitaan positiiviseksi tai negatiiviseksi. [7.]

3.2.2 Tulosten tulkinta

Fluoresenssi mitataan kahdesti jokaisesta testatusta näytteestä. Ensin mitataan tausta. Toinen mittaus tehdään substraatin inkuboinnin jälkeen. Suhteellinen fluoresenssiarvo, RFV, lasketaan vähentämällä tausta lopullisesta tuloksesta. Taulukossa 3 on kynnysarvot ja niiden tulkinta.

MiniVidaksella lasketaan RFV-arvot seuraavasti:

$$Testvalue = \frac{sampleRFV}{standardRFV}$$

Taulukko 3. Kynnysarvo ja tulkinta.

Testiarvo	Tulkinta
< 0.1	Negatiivinen
≥ 0.1	Positiivinen

Tulokseksi saadaan testiarvo. Mikäli arvo on suurempi tai yhtä suuri kuin kynnysarvo, niin näytteestä on löytynyt listeriabakteereita.

Jos tuloksen testiarvo on pienempi kuin kynnysarvo, näytteessä ei ole listeria-antigeenejä tai näytteen sisältämä listeria-antigeenipitoisuus on alle määritysrajan. [8.]

3.3 LPT-liemi

LPT-liemi mahdollistaa listerian selektiivisen rikastuksen ruokatuotteista ja tuotantoympäristön puhtausnäytteistä (pintanäytteet) käyttämällä VIDAS LPT-menetelmää. LPT-lientä käytetään vain VIDAS-analyysissä. Liemen koostumus perustuu puolifraseriin.

LPT-liemi on ravinteikas kasvualusta, joka sisältää erilaisia peptoneita. Liemi on puskuroidu, jotta pH säilyisi neutraalina, mikä suosii listerialajien lisääntymistä. Muiden mikro-organismien selektiivisyys (valikoivuus) on toteutettu litiumkloridilla, akriflaviinilla sekä nalidiksiinihapolla, jotka estävät muiden mikrobien kasvun. LPT-liemen koostumus on esitetty liitteessä 2. [9.]

3.4 Näytteiden valmistaminen

Näytettä laitetaan aseptisesti 25 g Stomacher-homogenisointipussiin ja kaadetaan 9-kertainen määrä LPT-lientä. Ympäristönäytteenä olevan liinan päälle kaadetaan sopi-

van verran LPT-lientä. Näytteet homogenoidaan Stomacher-laitella, paitsi liinanäyte, joka puristellaan käsin. Tuotenäytteet inkuboidaan 26 - 30 h +30 °C:ssa. Puhtausnäytteitä inkuboidaan 22 - 30 h +30 °C:ssa. Inkuboinnin jälkeen pusseja sekoitellaan vielä käsin. Kuvassa 7 on koko työn suoritus.

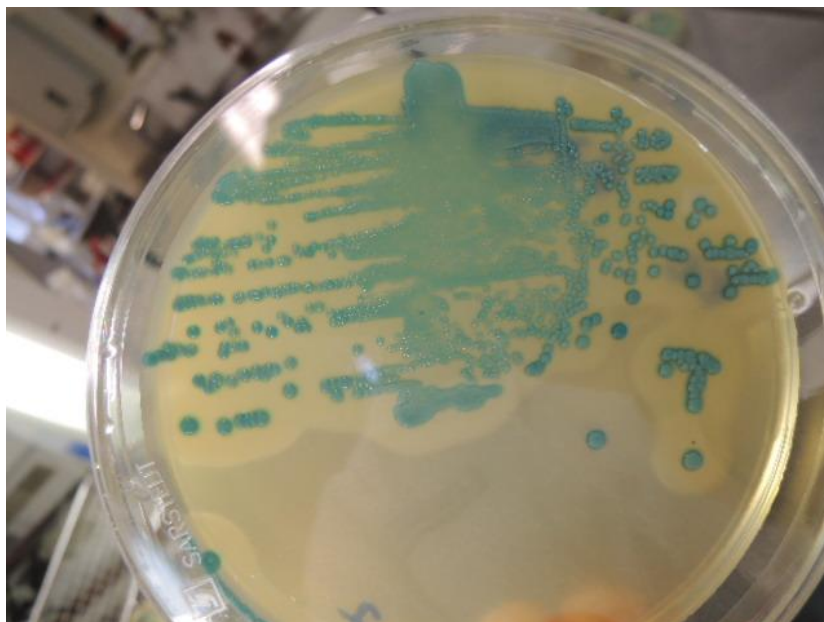
VIDAS-analyysia varten pipetoidaan 500 µl rikastuslientä LPT-liuskan näytekaivoon ja liuskaa kuumennetaan Heat and Go -laitteella (kuva 5) 5 ± 1 min 131 °C:ssa. Liuskan annetaan jäähtyä vähintään 10 min, jonka jälkeen sen voi asettaa MiniVidas-laitteeseen analysointia varten. [7.]



Kuva 5. VIDAS-analysointiliuskojen Heat and Go -lämmityslaite.

Heat and Go -laitetta käytettäessä on huomioitava, ettei sillä voi kuumentaa muna- tuote- tai siipikarjanäytteitä. Sen käyttö voi aiheuttaa saostumista tai koaguloitumista, jotka kumpikin voivat johtaa väärään negatiiviseen tulokseen. Tämä ilmiö johtuu siitä, että LPT-menetelmässä käytetään vain yhtä rikastuslientä toisin kuin LIS-menetelmässä, jossa on kaksi rikastuslientä, ja siirto toiseen rikastusliemeen liottaa näytteen (kanamuna/siipikarja) ja näin vähentää koaguloitumista tai saostuman muodostumista. Munatuotteet ja siipikarjanäytteet voidaan kuitenkin kuumentaa vesihau- teella.

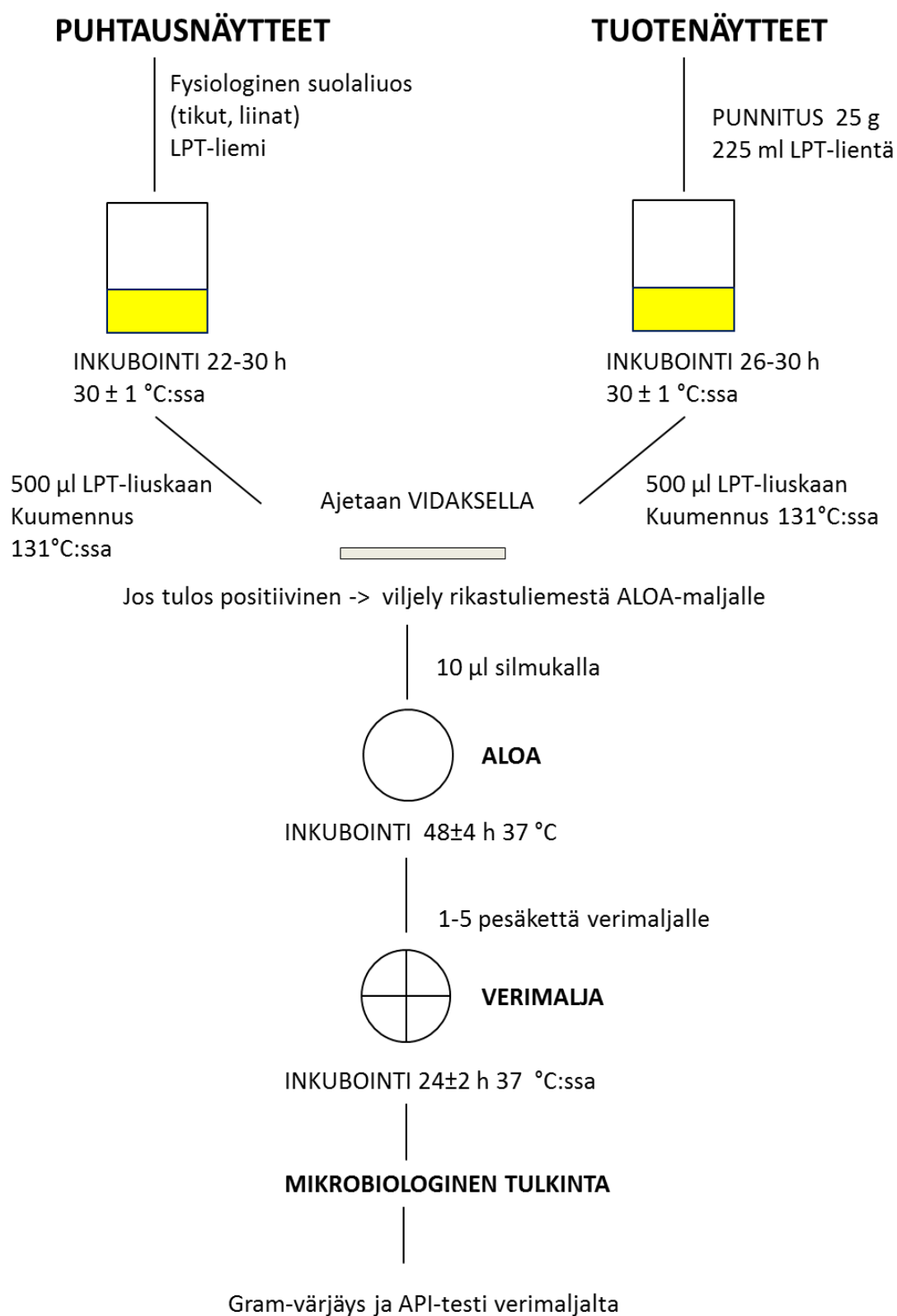
Mikäli VIDAS-ajon tulos on positiivinen, tehdään rikastusliemestä varmistusviljely (rikastuslientä voidaan säilyttää 2 - 8 °C:ssa, mutta viljely on aloitettava 72 h sisällä inkuboinnista) ALOA-agarille hajotusviljelynä. Maljaa inkuboidaan 48 ± 4 h 37 °C:ssa. [7.] ALOA-agarilla tyypilliset pesäkkeet ovat sinivihreitä ja *L. monocytogenes* -pesäkkeen ympärillä on saostumavyöhyke. Kuvassa 6 on ALOA-malja, jossa kasvaa *L. monocytogenes* -pesäkkeitä. ALOA-agarin koostumus on liitessä 1.



Kuva 6. *L. monocytogenes* -pesäkkeet ovat ALOA-maljalla sinivihreitä ja niiden ympärillä on saostumaa.

Tyypillisistä pesäkkeistä tehdään viisi puhtasviljelmää yhdelle verimaljalle sektoreittain. Jos ALOA-maljalla on vähemmän kuin viisi tyypillistä pesäkettä, otetaan varmistukseen ne kaikki. Maljoja inkuboidaan 24 ± 2 h 37 °C:ssa ja puhtasviljelmistä tehdään gramvärjäys ja tarvittaessa API-testi.

ALOA-agarin valmistajan mukaan agarilla ei kasva muut kuin listeria-suvun bakteerit sekä jotkut *Bacillus cereus*-suvun bakteerit. *B. cereus*-suvun bakteerit kasvavat epätyypillisen epäsymmetrisinä ja ne voivat olla väriltänsä valkoisia tai sinisiä, sekä niiden ympärillä on suuri halo. Validoinnin kolme matriisia sisältävät itsessään taustaflooraa, ja matriiseista tutkittiin kokonaisbakteerit. Jos maljoilla kasvaa muita kuin listeria-bakteereita ja varmistustestit osoittavat, että tyypilliset pesäkkeet osottautuvat *L. monocytogenes*-bakteereiksi, voidaan tämän perusteella osoittaa agarin spesifisyys.



Kuva 7. Näyte esikäsittelystä analysointiin.

3.5 API Listeria

API Listeria -liuskassa (BioMérieux) on kymmenen taskua, joissa on kylmäkuivattuja substraatteja. Taskuihin pipetoidaan bakteerisuspensiota ja liuskaa inkuboidaan 24 h +37 °C:ssa. Inkubaation aikana metaboliatuotteet aiheuttavat spontaanisti tai reagensien lisäyksen jälkeen värinmuutoksia, joiden avulla testit tulkitaan. Reaktio luetaan tulkintataulukon avulla ja identifiointi tapahtuu apiwebin profiilihakemiston perusteella. Kuvassa 8 on *L. monocytogenes*ksen tunnistus API Listeria -testillä. [10.]



Kuva 8. API Listeria -testin liuska.

4 Mikrobiologisen menetelmän validointi

Mikrobiologinen menetelmä validoidaan ennen sen käyttöönottoa laboratoriossa. Sen tarkoituksena on todistaa menetelmän tulosten luotettavuus ja oikeellisuus.

4.1 Mikrobiologisten menetelmien epävarmuus

Mikrobiologiset ja kemialliset analyysit eroavat toisistaan teoreettisesti. Kemiallisessa analyysissä erotetaan analyyytti matriisista erilaisilla menettelyillä. Jos analyyyttiä halutaan laimentaa, se tehdään monien vaiheiden kautta.

Mikrobiologiassa tutkittava näyte analysoidaan taustahäiritsijöiden läsnäollessa. Kasvualustalla tapahtuu analyytin erottelu. Kasvualustan koostumus ja olosuhteet sekä tutkittavien mikrobikantojen ominaisuuksien vaihtelu vaikuttavat menetelmän spesifisyyteen. Tutkittava näyte laimennetaan sellaiselle pitoisuustasolle, jolla on mahdollista laskea yksittäisten solujen muodostamat pesäkkeet mikrobiologisessa määrityksessä. Solumäärät näytteessä ovat kymmenestä muutamiin satoihin tutkittavassa määrässä. Rinnakkaisanalyyseissä solumäärät voivat vaihdella paljon. [11, s. 2.]

Mikrobit ovat eläviä organismeja, eikä niistä pystytä tekemään standardisoituja valmisteita, joiden todellinen pitoisuus olisi tiedossa. Täsmällisesti oikean tuloksen määrittäminen on vaikeaa. Oikeana tuloksena mikrobiologiassa pidetään menetelmän hyväksytyt arvot ja keskiarvotuloksen lähekkäisyyttä.

Näytteen homogenointi saattaa tuhota mikrobeja, ja se onkin yksi suurimmista epävarmuustekijöistä. Tutkittavasta materiaalista ei saada kuitenkaan mikrobeja täydellisesti irtaantumaan. Tämän vuoksi kiinteitä näytteitä tutkittaessa esiintyy voimakasta hajontaa. Analyysitulosten hajontaa lisäävät myös työntekijöistä johtuvat työskentelyerot, esimerkiksi pesäkkeiden tulkintaerot ja näytteen pipetoinnissa tapahtuvat erot. Matriisin ominaisuudet sekä taustamikrobiston luonne saattavat aiheuttaa ongelmia. [11, s. 3.]

4.2 Validoinnin suureet

4.2.1 Oikeellisuus

Mikrobiologiassa analyytti on elävä mikro-organismi. Sen todellista pitoisuutta eikä tulosten oikeellisuutta pystytään varmuudella arvioimaan. Sertifioiduilla referenssimateriaaleilla määritetään oikeellisuus. Referenssimateriaalien valmistajan ilmoitettua pitoisuutta pidetään oikeana tuloksena. Oikeellisuus joudutaan kuitenkin usein määrittämään käyttämällä sertifioiduttomia referenssimateriaaleja tai siirrostettuja näytteitä sertifioidujen referenssimateriaalien rajoitetusta saatavuudesta ja kalleudesta johtuen. [11, s. 6 - 7.]

Positiivinen tulos on silloin *virhepositiivinen*, kun siirrostettu näyte ei sisällä tutkittavaa mikrobia. Negatiivinen tulos on silloin *virhenegatiivinen*, kun siirrostettu näyte sisältää tutkittavaa mikrobia. [14, s. 4.]

4.2.2 Toteamis- ja määrittäysraja

Toteamisraja on pienin tutkittavan mikrobin pitoisuus, joka on mahdollista todeta tarkasti. Toteamisraja tulee määrittää erikseen jokaiselle tutkittavalle matriisille. Mikrobiologiassa on mahdollista määrittää toteamisraja vain kvalitatiiviselle menetelmälle. Näytteisiin siirrostetaan niin pieniä mikrobimääriä, että osa näytteistä antaa positiivisen ja osa negatiivisen tuloksen. [11, s. 7 - 8.]

Määrittäysraja on alhaisin mikrobipitoisuus, joka pystytään kvalitatiivisesti määrittämään validoitavalla menetelmällä. Kiinteitä näytteitä tutkittaessa määrittäysraja on yleensä maljavalulla < 10 pmy/g ja pintalevityksellä 100 pmy/g. Nestemäisiä näytteitä tutkittaessa maljavalulla 1 pmy/g tai pintalevityksellä 10 pmy/g. Määrittäysrajaa voidaan tarpeen vaatiessa alentaa lisäämällä näytemäärää ja rinnakkaisia määrittäyksiä. Toteamis- ja määrittäysrajaan vaikuttavat menetelmän selektiivisyys, spesifisyys, mikrobin ”tila” näytteessä sekä näytematriisi mikrobistoinen. [11, s. 8.]

4.2.3 Spesifisyys ja herkkyys

Spesifisyys tarkoittaa menetelmän kykyä löytää tutkittava mikrobi muiden mikrobin vaikutuksesta huolimatta. Spesifisyys määräytyy menetelmän alustan koostumuksen ja kasvuolosuhteiden sekä mikrobikantojen ominaisuuksien vaihtelun perusteella. Menetelmää validoitaessa pitää oppia tunnistamaan häiritsevien mikrobin joukosta tyypilliset pesäkkeet. [11, s. 8.]

Herkkyydellä havaitaan menetelmän vähäiset mikrobin pitoisuuksien vaihtelut jossakin materiaalissa. Tämä ominaisuus on tärkeä ja keskeinen osa tehtäessä validointia uutta menetelmää kehittäessä. [11, s. 8.]

4.2.4 Ulkoinen pätevyys

Tutkimuksia suorittaessa on tärkeää saada varmuudella oikeat tulokset. Onnistuminen laatutyössä osoitetaan osallistumalla ulkoiseen laadunvarmistukseen, ns. interkalibrointeihin. Interkalibroinnissa pätevä laboratorio valmistaa näytteitä, jotka tutkitaan muissa laboratorioissa. Lopuksi tulokset kootaan ja yhdistetään sekä käsitellään kansainvälisesti tunnetulla menetelmällä. Laboratoriot voivat sen jälkeen katsoa, miten omat tulokset ovat verrattavissa muiden tuloksiin ja siten saada varmistuksen omien tutkimustensa laadusta. Mikrobiologisten laboratorioiden pitää osallistua interkalibrointeihin vähintään kolmesti vuodessa. Interkalibrointien tarkoitus on poistaa ja selvittää ilmeneviä puutteita. [13, s. 55.]

5 Työn suoritus

5.1 Matriisien ja mikrobipitoisuuksien valinta

Mikrobeina käytetään ensisijaisesti referenssimateriaaleja, joiden mikrobipitoisuus tunnetaan. Niiden puuttuessa voidaan käyttää laboratorion itse tunnetuista kannoista valmistamia mikrobisuspensioita. Elintarvikkeet yleensä sisältävät mikrobeja, joten häiritseviä mikrobeja ei tarvitse lisätä erikseen.

Kvalitatiivisten menetelmien validoinnissa valitaan tutkittavaksi yleensä mikrobipitoisuuksia, joista toinen on lähellä toteamisrajaa ja toinen sitä kymmenenkertaisesti isompi. Toteamisraja selvitetään siirrostamalla matriisiin eri mikrobipitoisuuksia. Määrittämenetelmillä halutaan yleensä löytää myös alhaisimmat mikrobipitoisuudet.

Esikokeessa siirrostettiin *L. monocytogenes* (7644) -bakteereita laimennoksista 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} ja 10^{-9} suvisalaattiin. Tämän perusteella seuraavaan kokeeseen lisättiin vielä laimennos 10^{-10} , koska 10^{-9} antoi positiivisen tuloksen. Positiiviseen vertailunäytteen lisättiin suoraan puskuroidusta peptonivedestä 1 ml *L. monocytogenes* -kantaa. Lisäksi tutkittiin negatiiviset vertailunäytteet ja aerobisten mikrobien kokonaismäärä matriiseista.

Sahalahden laboratoriossa on tehty listeriatutkimuksia pääsääntöisesti lihatuotteista, elintarviketuotteista sekä puhtausnäytteistä. Ensin menetelmää testattiin pelkällä suvisalaatilla. Testien jälkeen valittiin loput kaksi matriisia. Validoitaviksi matriiseiksi valittiin siis suvisalaatti, kultakinkku ja iso häränjauhelihapihvi, sillä ne ovat laboratoriossa yleisimpiä analysoitavia näytteitä. Matriisit kontaminoitiin taulukon 4 mukaan.

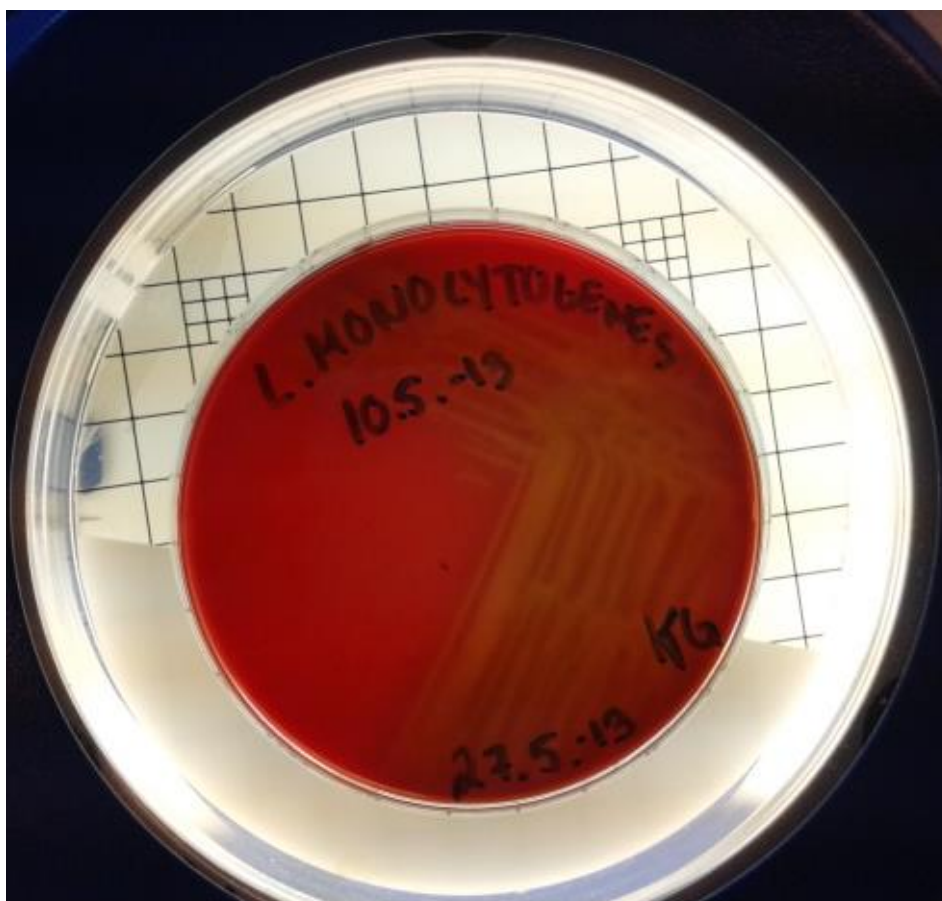
Taulukko 4. Matriisit ja *L. monocytogenes* -pitoisuudet.

Matriisi	<i>L. monocytogenes</i> -pitoisuus (pmy/g)
Iso häränjauhelihapihvi	10 ⁹ 10 ² 10 ¹ 10 ⁰ 10 ⁻¹ 0
Kultakinkku	10 ⁹ 10 ² 10 ¹ 10 ⁰ 10 ⁻¹ 0
Suvisalaatti	10 ⁹ 10 ³ 10 ² 10 ¹ 10 ⁰ 10 ⁻¹ 0

5.2 Keinotekoiseen kontaminointiin käytetyn kannan kasvatus ja valmistus

L. monocytogenes -kanta nuorennettiin säännöllisesti siirrostamalla puhtasviljelmää aina uudelle naudan verimaljalle hajotusviljelynä.

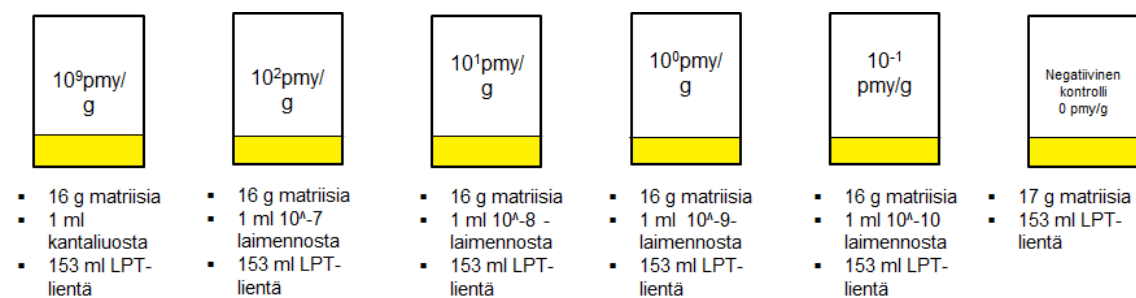
L. monocytogenes -verimaljalta siirrostettiin naudanveriagarille (Tammer-Tutkan Maljat Oy) puhtasviljelämä kontaminointitarkoitukseen. Verimaljaa inkuboitii 24 h 37 °C:ssa. Kuvasta 9 huomataan, että *Listeria monocytogenes* -pesäkkeitä ympäröi kapea hemolyyssikehä verimaljalla.



Kuva 9. Kontaminointiin käytetty *L. monocytogenes* -kanta verimaljalla.

Näytteiden siirrostusta varten kasvatettiin *L. monocytogenes* -kanta peptonivedessä 24 h + 37 °C:ssa. Ensimmäisessä testissä kasvatusliemestä tehtiin laimennokset 9 ml:n laimennoskuppeihin (LabRobot) -9 ja toisessa -10 asti. Ensimmäisessä testissä *L.*

vänä näytteet ajettiin MiniVidaksella. Tulokset ovat tulososiossa. Kuvassa 11 on esitetty *L. monocytogenes*in siirrostus matriiseihin.



Kuva 11. *L. monocytogenes*in siirrostaminen matriiseihin.

5.4 Maljojen lukeminen ja jatkotestit

ALOA-maljoilta katsottiin inkubointiajan kuluttua, kasvaako niillä *L. monocytogenes* -bakteerille tyypillisiä sinivihreitä pesäkkeitä, joiden ympärillä on saostumaa. Sinisiä pesäkkeitä muodostavat myös *L. innocua*, mutta pesäkkeiden ympärillä ei ole saostumaa. *L. ivanovii* sekä jotkut *Bacillus cereus* -bakteerit voivat muodostaa samantyyppisiä pesäkkeitä kuin *L. monocytogenes*. Epäselvien pesäkkeiden osalta tehdään lisätestejä.

Viidestä eri *L. monocytogenes* -epäilystä pesäkkeestä viljeltiin puhtaaksi naudanveriagarille. Veriagarin inkuboinnin jälkeen katsottiin, onko bakteeri hajottanut veriagaria ja jos on, siitä tehtiin API Listeria -testi (BioMérieux).

6 Tulokset

Sahalahden laatulaboratoriossa on tehty listeriatutkimuksia jo vuosia. Menetelmä on akkreditoitu elintarvike- ja tuotantoympäristönäytteille 2010 alkaen. Se on standardin ISO 11290-1 (1996) + muutoslehti (2004); BioMerieuxin Vidas-ohje (AFNOR 1999) mukainen ja menetelmän kanssa on osallistuttu menestyksekkäästi SLV:n interkalibrointihin.

6.1 Oikeellisuus

Kvalitatiivisten menetelmien kohdalla tarkastellaan, todetaanko tutkittava mikrobi eli antavatko siirrostetut näytteet positiivisen tuloksen ja 0-näyte negatiivisen. Matriiseihin siirrostettu tunnettu määrä *L. monocytogenes*tä vastasi tulosten mikrobilisäystä.

Positiiviset tulokset eivät olleet *virhepositiivisia*, koska näytteet sisälsivät *L. monocytogenes*tä. Tulokset todettiin myös ALOA-maljoilta, joilla näkyi sinivihreitä pesäkkeitä, joiden ympärillä oli saostumavyöhyke. Positiivisuus todettiin myös API Listeria -testillä. Negatiiviset tulokset eivät olleet *virhenegatiivisia*, koska näytteet eivät sisältäneet *L. monocytogenes*tä. Tulokset todettiin myös ALOA-maljoilta, joissa ei näkynyt *L. monocytogenekselle* tyypillisiä pesäkkeitä. Tuloksia verrattiin LIS-menetelmän antamiin tuloksiin.

Nollanäytteet käsiteltiin siirrostusvaiheessa viimeisenä, koska ne paljastaisivat mahdollisen tapahtuvan kontaminaation analyysin aikana. Kaikista matriiseista analysoitiin nollanäytteet, joihin ei lisätty *L. monocytogenes*tä. Tällä tavoin saadaan selville matriiseissa mahdollisesti kasvavat listeriabakteerit. Nollanäytteistä ei havaittu listeriaa, joten näytteet eivät sisältäneet itsessään listeriabakteereita.

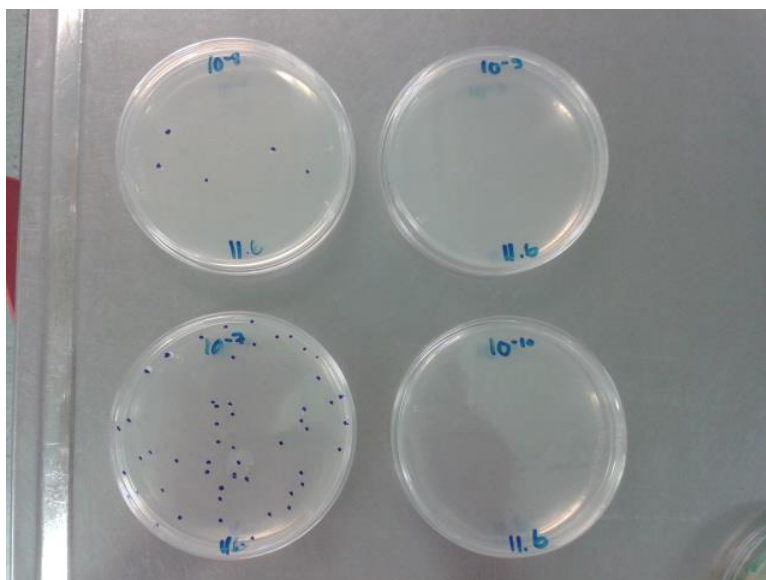
Tutkittiin 32 elintarvike- ja ympäristönäytettä rinnakkain LPT- ja LIS-menetelmällä. Tulokset ovat verrattavissa toisiinsa. Ainoastaan kahdessa näytteessä oli vastakkainen tulos. Niistä tehtiin uusintatutkimukset, joista toisen tulos todettiin positiiviseksi. Näytteestä 21 tehtiin vielä toisen kerran uusi tutkimus, jonka tulos oli myös negatiivinen. LIS-menetelmällä tutkitun näytteen 21 positiivisen tuloksen RFV-arvo oli vain 492 ja testiarvo 0,16; listeriapitoisuus on hyvin pieni. Tämän perusteella voidaan todeta, että

aina ei välttämättä tutkittaessa löydy listeriaa, sillä se on vain osassa näytettä, eikä kaikkialla näytteessä. Luettelo analysoiduista näytteistä on liitteessä 3.

6.2 Toteamis- ja määrittysraja

Alhaisin pitoisuus, josta *L. monocytogenes* todettiin, oli noin 7 pmy. Listeriaa todettiin kaikissa matriiseissa, joihin oli siirrostettu 7 pmy. Ainoastaan isosta häränjauhelihapihvistä pystyttiin osoittamaan alhaisempi pitoisuus 1 pmy/g.

Neljästä laimmeimmasta siirrostuslaimennoksista tehtiin viljely PCA-maljoille siirrostus-suspensioiden mikrobipitoisuuden määrittämiseksi. Kuvassa 12 on esitetty laimennos-sarjan PCA-maljatulokset.



Kuva 12. Puskuroidussa peptonivedessä inkuboidun (+ 37 °C, 24 h) *L. monocytogenes* -kannan laimennossarjan pesäkkeiden lukumäärät PCA-alustalla.

Taulukossa 5 on esitetty rinnakkaisten maljojen *L. monocytogenes* -pitoisuuksien keskiarvo sekä siirrostettujen näytteiden VIDAS-tulokset.

Taulukko 5. Siirrostettu *L. monocytogenes* -bakteerin määrä sekä VIDAS-analyysien tulokset. + positiivinen VIDAS-tulos; - negatiivinen VIDAS-tulos.

<i>L. monocytogenes</i> - pitoisuus /näyte	VIDAS-tulos		
	Suvisalaatti	Iso häränjauheliha- pihvi	Kultakinkku
700 000 000 pmy	+	+	+
62 pmy	+	+	+
7 pmy	+	+	+
1 pmy	-	+	-
0.1 pmy	-	-	-
0 pmy	-	-	-

6.3 Spesifisyys ja herkkyys

Menetelmä on spesifi, sillä siirrostettu *L. monocytogenes* löytyi näytteestä taustasta huolimatta. Matriiseista tutkittiin myös kokonaismikrobit, joista ilmeni, että matriiseissa itsessään kasvoi muita mikrobeja. Siirrostamaton nollanäyte ei myöskään antanut positiivista tulosta.

Elatusaineen ansiosta ei-haluttujen bakteerikantojen kasvu estyy muun muassa litiumkloridin avulla. ALOA-maljan listeriaspesifisyys ilmenee *L. monocytogenes*in β -glukosidaasiaktiiviteetista, jonka vaikutuksesta kromogeenisen substraatin hydrolyysi aiheutti sinivihreän värin pesäkkeille. Fosfolipaasiaktiivisuuden johdosta aiheutui taas halo *L. monocytogenes* -pesäkkeen ympärille.

6.4 Ulkoinen pätevyys

Menetelmän ulkoinen pätevyys osoitettiin osallistumalla SLV:n järjestämään vertailukokeeseen. Vertailukokeen suoritti laborantti Minna Kuusniemi.

SLV:n lähettämä pakkaus sisälsi kolme putkea, jotka olivat tuntemattomia näytteitä. Jokainen viali laimennettiin ennen analyysijä. Näytteet analysoitiin Vidas LIS- ja LPT-menetelmillä. Näyte 1 ei sisältänyt ollenkaan listeriaa. Näyte 2 sisälsi *L. monocytogenes* ja näyte 3 sisälsi *L. ivanoviita* sekä *L. seeligeriä*. LPT-menetelmän tulokset olivat täsmälleen samanlaiset kuin SLV:n.

LPT-menetelmällä tutkittiin kolme näytettä, joista kaksi oli positiivisia. Kaikista siirrostettiin näytettä ALOA-maljoille. Näytteen 1 maljalla ei kasvanut mitään, niin kuin Vidas totesi. Näytteen 2 maljalla kasvoi sinivihreitä pesäkkeitä, joiden ympärillä kellertävää saostumaa, mikä on *L. monocytogenekselle* tyypillistä. Näytteen 3 maljalla kasvoi myös sinivihreitä pesäkkeitä, joiden ympärillä oli kellertävää saostumaa. Sinivihreiden pesäkkeiden päällä kasvoi muutama valkoinen pesäke. Näytteiden 2 ja 3 maljoilta siirrostettiin naudan verimaljolle viljelmät viidestä pesäkkeestä. Inkuboinnin jälkeen tehtiin API-testit. API-testissä ilmeni, että näyte 2 sisälsi *L. monocytogenes* 98,5 %:n tunnistuksella. Näytteen 3 API-testissä tunnistettiin listeria 99,9 %:n todennäköisyydellä *L. ivanoviiksi*.

LIS-menetelmällä kolmesta näytteestä vai yksi antoi positiivisen tuloksen. Vidas ei todennut ollenkaan listeriaa näytteessä 3, vaikka se sisälsi *L. ivanoviita* ja *L. seeligeriä*. Näytteestä 3 tehtiin uusi tutkimus, jonka tulos oli positiivinen.

Tarkastelemalla tarkemmin Vidaksen antamaa tulostusraporttia, havaittiin näytteen 3 osalta, että sen TV- sekä RFV-arvot ovat hiukan koholla, mutta eivät ylittäneet TV 0,05 raja-arvoa, jolloin tulos on negatiivinen. Taulukossa 6 on tulokset *Listeria spp* osalta.

Taulukko 6. SLV:n, LPT:n ja LIS:n tulokset koottuna.

	Näyte 1	Näyte 2	Näyte 3
SLV	-	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. ivanovii</i> <i>L. seeligeri</i>
LPT	-	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. ivanovii</i>
LIS	-	<i>L. monocytogenes</i>	1. – 2. <i>L. ivanovii</i>

6.5 Ajan käytön ja kustannusten vertailu

LPT-menetelmässä käytetty LPT-kitti, joka sisältää 60 liuskaa sekä 60 kärkeä, maksaa 318 e. LPT-liemipullo maksaa noin 3,5 e. Yksi tutkimus maksaa siis 8,8 e. LPT-menetelmällä tulos saadaan jo seuraavana päivänä.

LIS-menetelmässä käytetty LIS-kitti maksaa noin 360e. Fraser-putket (20 kpl), joissa on Fraser-lientä maksaa noin 23 e. Esirikastukseen käytettävä ½-fraser-jauhepurkki (500 g) maksaa noin 75 e. ½-fraserliemeen kuuluvat kaksi supplementtia, jotka maksavat 5,3 e. (Rikastusliemen valmistukseen 1 l kuluu 55 g jauhetta ja kaksi supplementtipulloa, ja yhteen tutkimukseen menee 225 ml lientä). Yksi tutkimus maksaa noin 10 e. Tuloksen saantiin kuluu 4 vrk. (Ensimmäisenä päivänä homogenoidaan näyte rikastusliemeen ja annetaan kasvaa + 30 °C:ssa 24 h, jolloin se siirretään ½-fraserputkeen ja jatketaan inkubointia 37 °C:ssa kaksi päivää, jonka kuluttua näyte voidaan ajaa MiniVi-daksella.)

7 Päätelmät

Opinnäytetyön tarkoituksena oli osoittaa, että Saarioisen laboratoriossa käytetään LPT-menetelmää luotettavasti ja sillä saadaan oikeita tuloksia. Validointi suoritettiin siirrotamalla *L. monocytogenes* -bakteereita kolmeen eri näytematriisiin. Matriiseita analysoitiin uudella menetelmällä ja tuloksia verrattiin siirrostettuun listeriapitoisuuteen.

Analysoitu määrittäjäraja on riittävä ja sillä pystytään osoittamaan pienetkin mikrobipitoisuudet taustakasvun joukosta. Menetelmän toimivuutta tutkittiin 32 rinnakkaisella elintarvike- ja ympäristönäytteellä, joista positiivisiksi todettiin 12. SLV:n interkalibroinnissa todettiin *L. monocytogenes* oikeasta tuntemattomasta näytteestä sekä LPT- että LIS-menetelmillä. Myöskään eri matriisit eivät vaikuttaneet menetelmän toimivuuteen.

Listerian tutkiminen LPT-menetelmällä on nopeaa ja helppoa, sillä tutkimuksissa käytetään valmiita reagenssejä. Tämän ansiosta tulos saadaan jo seuraavana tutkimuspäivänä. Validoinnin perusteella testattua listerian todentamismenetelmää voidaan pitää pätevänä osoittamaan *Listeria* spp -bakteerit erilaisista elintarvike- ja ympäristönäytteistä.

Lähteet

- 1 Korkeala, Hannu . Elintarvikehygieniä. Helsinki: WSOY. 2007.
- 2 Pönkä, Antti . Ruokamyrkytykset ja elintarvikehygieniä. Suomen ympäristöterveys Oy. 2007.
- 3 Johansson, Tuula. Elintarvikkeiden mikrobiologiset vaarat, *L. monocytogenes*. Eviran julkaisuja 1/2010.
- 4 Evira. Verkkodokumentti. <http://www.evira.fi/portal/45985>. Luettu 19.11.2013.
- 5 BioMerieux. Verkkodokumentti. http://www.biomerieux-nordic.com/servlet/srt/bio/northern/dynPage?doc=NTH_IND_FDA_PRD_G_PRD_NDY_48. Luettu 19.11.2013.
- 6 BioMérieux, MiniVIDAS SERVICE MANUAL 005-90902.REV 0494.
- 7 VIDAS UP Listeria (LPT). REF 30 126.
- 8 VIDAS Listeria (LIS). REF 30 700.
- 9 LPT Broth. REF 410845 / 410846 / 410848.
- 10 API Listeria. REF 10 300.
- 11 Mikrobiologisten menetelmien validointiohje. Valvonta 13/1997. Helsinki: Elintarvikevirasto.
- 12 Elintarvikkeiden mikrobiologiset vaatimukset, komission asetuksen (EY) No 2073/2005 soveltaminen. Eviran ohje 10501/1. Elintarviketurvallisuusvirasto. 2009.
- 13 Pohjoismainen Elintarvikkeiden Metodiikkakomitea. NMKL Laadunvarmistusohjeita mikrobiologisille laboratorioille, Raportti nro 5, 2. painos. 1994.
- 14 Evaluation of results from qualitative methods. NMKL Procedure No 20. 2007.
- 15 THL, valtakunnallinen tartuntatautirekisteri. Verkkodokumentti. http://www.zoonosikeskus.fi/attachments/zoonosist/listerioosi/kuva_tartuntatautirekisteriin_ilmoitetut_listerioositapaukset_2000.pdf. Luettu 13.11.2013

ALOA-agarin koostumus

ALOA-agarin valmistaminen:

Liuetetaan 70,5 g HAL010-kuivaelatusainetta (Harlequin Listeria Chromogenic Agar, 120119/101) 950 ml:aan tislattua vettä. Valmistetaan elatusainekeittimellä 15 min 121 °C:ssa ja jäädytetään 48 - 50 °C:seen. Lisätään kaksi lisäainepulloa X072-supplementtia (lot. 299891), jotka ovat liuotettu 5 ml:aan tislattua vettä. Lisätään vielä kaksi lisäainepulloa 48 - 50 °C:een esilämmitettyä X010-supplementtia (lot. 122294). pH säädetään 1 ml:llä HCl 7,3 ± 0,2. *L. monocytogeneksellä* testataan aina maljaerän toimivuus.

HAL010		X072-supplementti		X010-supplementti	
Batch number 120119/101		Lot. 299891		Lot. 122294	
reagenssit	g/l	reagenssit	mg/l	reagenssit	mg/l
peptoni	18,0	polymyxin B	10	sykloheksimidi	50
tryptoni	6,0	ceftazidiimi	20	nalidiksiinihappo	20
hiivauute	10,0	(ceftazidime)		Fosfatidyyli-	~600
litiumkloridi	10,0			inositoli	
natriumkloridi	5,0				
vedetön dinatriumvetyor-	2,5				
tofosfaatti					
natriumpyruvaatti	2,0				
glukoosi	2,0				
kaliumglyserofosfaatti	1,0				
magnesiumsulfaatti	0,5				
x-glukosidi	0,05				
agar	13,5				

LPT-liemen koostumus

LPT-liemi sisältää seuraavat aineet:

Reagenssi	Määrä (g)
enstymaattinen uute eläimen kudoksesta	5,0
entsymaattinen naudan kaseiiniuute	5,0
lihauute	5,0
hiivauute	5,0
puskuri	18,32
litiumkloridi	6,0
suolasekotus	11,2
glukoosi	2,0
akriflaviini	0,0125
nalidiksiinihappo	0,01
tislattu vesi	1000

